

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013159436

WPI Acc No: 2000-331309/200029

XRAM Acc No: C00-100451

XRPX Acc No: N00-249503

Carriers for immobilizing a biologically active substance comprising a base material insoluble in solvents and a compound having an isocyanate or a carbodiimide group useful in assay methods.

Patent Assignee: NISSHINBO IND INC (NISN); MATSUMURA Y (MATS-I); SHIOHATA N (SHIO-I); SUZUKI O (SUZU-I)

Inventor: MATSUMURA Y; SHIOHATA N; SUZUKI O

Number of Countries: 027 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 1001267	A2	20000517	EP 99308958	A	19991110	200029 B
JP 2000146971	A	20000526	JP 98318925	A	19981110	200033
JP 2000146978	A	20000526	JP 98318924	A	19981110	200033
<u>US 20010055762</u>	A1	20011227	US 99435939	A	19991109	200206

Priority Applications (No Type Date): JP 98318925 A 19981110; JP 98318924 A 19981110

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 1001267	A2	E	16	G01N-033/545	
------------	----	---	----	--------------	--

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

JP 2000146971	A		10	G01N-033/543	
---------------	---	--	----	--------------	--

JP 2000146978	A		10	G01N-033/547	
---------------	---	--	----	--------------	--

US 20010055762	A1			C12Q-001/68	
----------------	----	--	--	-------------	--

Abstract (Basic): EP 1001267 A2

NOVELTY - Carriers (I) for immobilizing a biologically active substance comprising a base material insoluble in solvents and a compound having (a) an isocyanate or (b) a carbodiimide group bound to the surface of the base material via a covalent bond.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for:

(A) a method of producing a carrier (Ia) comprising covalently binding a compound having (i) more than two isocyanate groups, (ii) more than 1 isocyanate group and more than 1 functional group other than isocyanate or (iii) more than 1 isocyanate group and a halogen atom, to a functional group on the surface of the base material, leaving at least one free isocyanate group, the functional group is capable of covalently binding to an isocyanate group, a functional group other than isocyanate, or a halogen;

(B) a method of producing a carrier (Ib) comprising covalently binding a compound having (i) more than two carbodiimide groups, (ii) more than 1 carbodiimide groups and more than 1 functional group other than carbodiimide, to a functional group on the surface of the base material insoluble in solvents with leaving at least one free carbodiimide group, the functional group is capable of covalently binding to an carbodiimide group or a functional group other than carbodiimide;

(C) a method of immobilizing a biologically active substance comprising contacting a biologically active substance that is reactive with an isocyanate or carbodiimide group with (I);

(D) a method for assaying a biologically active substance comprising reacting a first substance which is biologically active and

immobilized on a carrier with a second substance capable of specifically binding to the first substance, and detecting the second substance which is indirectly bound or unbound to the carrier via a bond between itself, to analyze the first or the second substance in a sample, where the carrier is (I) and the first substance is immobilized on the carrier via the isocyanate or the carbodiimide group.

USE - (I) are useful in assay methods e.g. in clinical tests, in inspection of food and medicolegal examination.

ADVANTAGE - When a base material insoluble in solvents having an isocyanate group on its surface is used as a carrier, a biologically active substance can be immobilized simply and efficiently on a carrier regardless of the shape of the carrier. (I) can be used to detect various biologically important substances with high sensitivity and high accuracy.

pp; 16 DwgNo 0/0

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - PHARMACEUTICALS - Preferred Carrier: The base material is made of a plastic, an inorganic polymer, a metal, a natural polymer or a ceramic.

Preferred Method: In (C) the biologically active substance is a protein, a peptide, another substance that binds to an antibody or a nucleic acid. In (D) the first substance is a nucleic acid and the second substance is another nucleic acid having a nucleotide sequence substantially complementary to the sequence of the first nucleic acid. The first substance is a protein, peptide, a substance binding to an antibody, which specifically binds to the first substance.

Title Terms: CARRY; BIOLOGICAL; ACTIVE; SUBSTANCE; COMPRISE; BASE; MATERIAL; INSOLUBLE; SOLVENT; COMPOUND; ISOCYANATE; CARBODIIMIDE; GROUP; USEFUL; ASSAY; METHOD

Derwent Class: B07; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/68; G01N-033/543; G01N-033/545; G01N-033/547

International Patent Class (Additional): C07K-017/12; C07K-017/14; C12N-011/00; C12N-015/09; G01N-033/551; G01N-033/553

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C03; B04-E01; B04-G01; B04-N04; B11-C08E; B12-K04; B12-M05; D05-H09; D05-H10; D05-H11

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M750 M905 N102 Q435 RA00NS-K RA00NS-A

02 M423 M750 M905 N102 Q435 RA00H3-K RA00H3-A

03 M423 M750 M905 N102 Q435 RA00H1-K RA00H1-A

Chemical Fragment Codes (M6):

04 M905 Q435 R120 R150 R502 R515 R521 R613 R614 R627 R630 R631 R637 R639

Specific Compound Numbers: RA00NS-K; RA00NS-A; RA00H3-K; RA00H3-A; RA00H1-K; RA00H1-A

Key Word Indexing Terms:

01 93605-0-0-0-CL, DET 184616-0-0-0-CL, DET 184611-0-0-0-CL, DET

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-146971

(P2000-146971A)

(43)公開日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 5	G 0 1 N 33/543	5 2 5 U 4 B 0 2 4 5 2 5 W 4 B 0 3 3
C 0 7 K 17/12		C 0 7 K 17/12	4 B 0 6 3
17/14		17/14	4 H 0 4 5
C 1 2 N 11/00		C 1 2 N 11/00	

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-318925

(22)出願日 平成10年11月10日(1998.11.10)

(71)出願人 000004374

日清紡績株式会社

東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号

(72)発明者 鈴木 収

東京都足立区西新井栄町1-18-1日清紡

績株式会社東京研究センター内

(72)発明者 塩畑 奈美子

東京都足立区西新井栄町1-18-1日清紡

績株式会社東京研究センター内

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的活性物質の固定化用担体

(57)【要約】

【課題】 タンパク質、核酸などの活性物質を、簡便、効率的にかつ強固に担体に結合させる。

【解決手段】 表面にイソシアネート基を有する基材を生物学的に活性な物質を固定するための担体とし、この担体を、担体に固定化された生物学的に活性な第1の物質と、この第1の物質に特異的に結合し得る第2の物質とを反応させ、前記第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、試料中の第1の物質又は第2の物質を分析する方法に用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体。

【請求項2】 溶剤不溶性の基材表面にイソシアネート基を有する化合物が共有結合を介して担持されたことを特徴とする請求項1記載の担体。

【請求項3】 前記基材の材質がプラスチック、無機高分子、金属、天然高分子およびセラミックから選ばれることを特徴とする請求項1または2記載の担体。

【請求項4】 2個以上のイソシアネート基を有するまたは1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物を、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは前記イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材の官能基に、前記化合物の有するイソシアネート基の少なくとも1個を残して共有結合させる工程を含む、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体の製造方法。

【請求項5】 表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体に、イソシアネート基と反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることを特徴とする生物学的に活性な物質の固定化方法。

【請求項6】 生物学的に活性な物質がタンパク質、ペプチド、その他の抗体結合性物質および核酸から選ばれる請求項5記載の固定化方法。

【請求項7】 担体に固定化された生物学的に活性な第1の物質と、この第1の物質に特異的に結合し得る第2の物質とを反応させ、前記第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、試料中の第1の物質又は第2の物質を分析する方法において、前記担体として、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体を用い、前記第1の物質はイソシアネート基を介して担体に固定化されることを特徴とする、生物学的に活性な物質の分析法。

【請求項8】 前記第1の物質は核酸であり、第2の物質はこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有する核酸である請求項7記載の分析法。

【請求項9】 前記第1の物質はタンパク質、ペプチドまたはその他の抗体結合性物質であり、第2の物質はこれに特異的に結合し得るタンパク質、ペプチドまたはその他の抗体結合性物質である請求項7記載の分析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸、抗体、抗原

など生物学的に活性な物質を固定するための担体及びその製造方法並びにこれを用いた生物学的に活性な物質の固定化方法及び分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】臨床検査、食品検査、法医学検査などの分野において、検体中に存在する核酸、抗体、抗原など生物学的に活性な物質を検出、同定する方法として、目的物質に応じて核酸プローブ法、酵素免疫測定法などが用いられている。

【0003】核酸を検出する分野としては、病原微生物などの菌種同定、法医学におけるDNA鑑定などがある。核酸の検出においては、通常、標的となる核酸と相補的な配列を有する核酸を用い、このものを酵素などで直接、またはハプテンなどを介して間接的に標識する。この標識核酸と標的となる核酸をハイブリダイズさせる。ハイブリダイズしなかった標識核酸を除くかまたは標識部分を不活性化したのちに、標識部分を検出する事により標的核酸の存在及び量を確認できる。

【0004】また、抗原、抗体などを検出する分野としては、核酸と同様に病原微生物などの菌種同定の他、種々の臨床検査などがある。抗原、抗体の検出に用いられる酵素免疫測定法の1形態である競合的酵素免疫測定法は、次のようにして行われる。ポリスチレンビーズ、マイクロタイタープレート、チューブなどの固相表面に抗体または抗原を固定化し、固相表面に一定量の検体溶液を添加した後、抗原酵素複合体または抗体酵素複合体を加える。固相表面に抗体を固定化した場合には、検体中の抗原と抗原酵素複合体とが固相表面に固定化された抗体との結合反応において競合し、固相表面に抗原を固定化した場合には、検体中の抗原と固相表面に固定化された抗原とが抗体酵素複合体と結合反応で競合させる。

【0005】一定時間経過後に、抗体を固定化した場合には、固定化抗体に結合していない抗原および抗原酵素複合体を洗浄し除去する。また、抗原を固定化した場合には、未反応の検体中の抗原、抗体酵素複合体および検体中の抗原と抗体-酵素複合体との結合物を洗浄し除去する。このときの洗浄は、洗浄液を固相部に満たしたのち、洗浄液を捨て、再び固相部に洗浄液を満たして捨てるという洗浄操作を通常数回から十回程度繰り返す。この操作を一般にB/F分離と呼び、酵素免疫測定法を原理とする検査では必須の操作である。

【0006】最後に、抗原又は抗体の標識に用いた酵素に対する発色基質液を固相部に加えて、残存する酵素により発色させる。このとき用いる酵素はペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが一般的である。発色に用いる基質はそれぞれの酵素に適したものをを用いる。検体液中に標的となる抗原が多く存在すれば残存する抗原酵素複合体あるいは抗体酵素複合体の量が減り、結果として発色強度が弱くなる。発色強度は一般的に比色計を用いて測定する。

【0007】また、酵素免疫測定法の他の態様であるサンドイッチ酵素免疫測定法では、抗体を固相表面に固定化し、固相表面に検体液を加える。一定時間経過後、固相表面の抗体に結合していない抗原を洗浄し除去する。次いで抗体酵素複合体を一定量加える。一定時間経過後、固相表面の抗原に結合していない抗体酵素複合体を洗浄除去したのち、固相表面に発色基質を加えて発色させる。この発色強度を測定することにより、検体液中の抗原濃度を定量することが可能になる。

【0008】上述のように従来の核酸の検出法、競合的酵素免疫法、サンドイッチ酵素免疫法などにおいては、チューブ、マイクロタイタープレート、メンブランフィルター、ビーズなどの固相表面に抗体、抗原、酵素、核酸などを固定化することが非常に重要である。そのため、生物学的活性物質を固定化する種々の方法が公表されている。たとえば、タンパク質では、

①ジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による基材結合法やUgi反応による基材結合法などのような、タンパク質を架橋剤や縮合剤等を用いて基材に化学結合させる方法（「固定化酵素」〔千畑一郎 編、講談社サイエンティフィック（1986）〕第9-41ページ参照）、

②イオン結合により基材に固定する方法（「固定化酵素」第41-43ページ参照）、

③物理吸着により基材に固定する方法（「固定化酵素」第43-45ページ参照）、
などが知られている。

【0009】また核酸では、

①5'末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定（P.J. R. Day, P.S. Flora, J.E. Fox, M.R. Walker, Biochem. J., 278, 735-740 (1991)参照）などのような修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法（尚、この範疇に属する他の方法については、Soren R.R., Mette R.L., Svend E.R., Anal. Biochem., 198, 138-142 (1991), Jonathan N.K., Joseph L.W., Joseph P.D., Rachel E.M., Mary C., Eugene L.B., Nucleic Acids Res., 15, 2891-2909 (1987), Allan J.M., Jeffrey R.B., Terence W.P., Biochem. J., 191, 855-858 (1980), J.A. Running, M.S. Urdea, BioTechniques, 8, 276-279 (1990)などに記載されている。）、

②核酸を、UV照射あるいは加熱処理によりニトロセルロースまたはナイロン膜上に吸着固定（J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, page 2.109-2.113 and page 9.34-9.46）したり、マイクロプレート上に物理吸着させ固定（G.C.N. Parry and A.D. B. Malcolm, Biochem. Soc. Trans., 17, 230-231 (1989)）するなどの物理吸着で固定する方法、

③ポリカルボジイミドコート基材を用いて固定化する方

法（特開平8-23975号公報、特開平8-334509号公報）、
などが知られている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記のような従来方法には難点のあることが指摘されていた。例えば、化学結合による方法では、特殊試薬が必要なばかりか、例えばペプチド結合を介して固定化しようとする場合は、活性物質あるいは基材のどちらか一方にアミノ基を、残る片方にはカルボキシル基を導入する必要があり、さらに、導入された官能基同士を縮合試薬で処理して固定化する工程を経なければならないというように、操作が複雑となることを避けられない。

【0011】また化学結合では、例えばグルタルアルデヒドを架橋剤として使用するには、基材と活性物質の双方にアミノ基が存在せねばならないというように、基材自体に官能基が必要なために基材の選択が必要となる結果、固定に適した基材の選択が困難になり、加えて、たとえば天然のDNAや修飾基を持たない合成DNAなどの反応性の乏しい官能基（末端リン酸基、末端ヒドロキシル基等）しか有しないものについては化学反応による方法を用いることが困難であるというように、活性物質に活性官能基が無い場合は固定できないという難点がある。

【0012】一方、物理吸着には、基材の吸着性能に固定化量が左右されたり、吸着した活性物質が脱離しやすく、活性物質が低分子（オリゴマー）の場合、基材との相互作用が弱いと、吸着しにくいという難点がある。

【0013】また、基材表面をポリカルボジイミドで被覆する方法では、使用条件によっては、基材とポリカルボジイミドとの熱膨張率の相違や摩擦などによる皮膜の剥がれがおき、これが固定量の低下や、検出結果のバラツキの原因となった。

【0014】以上のようにタンパク質、核酸などの活性物質の検出において重要な固定化には多くの問題点を残している。本発明は、簡便、効率的にかつ強固に生物学的に活性な物質を固定できる担体および、それを用いて生物学的に活性な化合物を検出する方法を提供するためになされたものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を続けた結果、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材を担体として、その表面にイソシアネート基を介して生物学的に活性な物質を固定させれば、担体の形状に関わらず簡便かつ効率的に活性物質を固定化することができ、さらに、この様な担体を用いれば、担体に固定した活性物質を利用する種々の生物学的に重要な物質の検出が高感度かつ高精度で行えることを見だし本発明の完成に至った。

【0016】すなわち本発明は、表面にイソシアネート

基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体である。本発明の担体として具体的には、溶剤不溶性の基材表面にイソシアネート基を有する化合物が共有結合を介して担持された生物学的活性物質の固定化用担体を挙げることができる。

【0017】本発明の担体に用いる溶剤不溶性の基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子およびセラミックから選ばれる1種または2種以上が挙げられる。

【0018】また、本発明は2個以上のイソシアネート基を有するまたは1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物を、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは前記イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材の官能基に、前記化合物の有するイソシアネート基の少なくとも1個を残して共有結合させる工程を含む、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体の製造方法を提供する。

【0019】さらに、本発明は表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体に、イソシアネート基と反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることを特徴とする生物学的に活性な物質の固定化方法を提供する。

【0020】本発明の固定化方法における生物学的に活性な物質として具体的には、タンパク質、ペプチド、その他の抗体結合性物質および核酸から選ばれる1種または2種以上が挙げられる。

【0021】本発明はさらに、担体に固定化された生物学的に活性な第1の物質と、この第1の物質に特異的に結合し得る第2の物質とを反応させ、前記第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、試料中の第1の物質又は第2の物質を分析する方法において、前記担体として、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体を用い、前記第1の物質はイソシアネート基を介して担体に固定化されることを特徴とする、生物学的に活性な物質の分析法を提供する。

【0022】本発明の分析法において、第1の物質、第2の物質の組み合わせとして具体的には、第1の物質が核酸であり、第2の物質がこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有する核酸である組み合わせ、第1の物質がタンパク質、ペプチドまたはその他の抗体結合性物質であり、第2の物質がこれに特異的に結合し得るタンパク質、ペプチドまたはその他の抗体結合性物質である組み合わせ等が挙げられる。

【0023】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

<1>担体およびその製造方法

本発明の担体は、生物学的に活性な物質を固定化するための担体であり、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなることを特徴とする。

【0024】(1) 基材

本発明の生物学的に活性な物質を固定化する担体に用いられる基材は、前記担体の支持体としての役割を果たすものであって、溶剤不溶性である。詳細には、本発明に用いる基材は、後述の様に表面にイソシアネート基が導入され、ついで、担体として生物学的に活性な物質を固定化し、さらに、活性物質を固定した状態で生理化学的な生産、分析等に供されるが、これらの各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性である。本発明に用いる基材は、上記の様に溶剤不溶性であって、基本的には、常温もしくはその付近の温度範囲内(0~100℃)で固体又はゲル状であるものであれば特に制限されない。この様な担体基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

【0025】プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミドおよびアクリル樹脂などが、無機高分子としては、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、およびグラファイト等が、金属としては、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネットおよびアバタイト等の常温固体金属が、天然高分子としては、セルロース、セルロース誘導体、キチン、キトサン、アルギン酸およびアルギン酸塩等が、セラミックとしては、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素および炭化ホウ素等を例示することができる。

【0026】上記基材の形状としては、例えば、フィルム、平板、粒子、成型品(ビーズ、ストリップ、マルチウェルプレートのウェルまたはストリップ、チューブ、メッシュ、連続発砲フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライドおよび細胞培養容器)、ラテックスを挙げることができ、またその大きさについては、当然であるが特に制限はない。

【0027】(2) 担体の製造

本発明の生物学的に活性な物質を固定化するための担体は、上記溶剤不溶性の基材の表面にイソシアネート基を有するものである。この様な本発明の担体を得るには、例えば、担体とした際に生物学的に活性な物質を固定化するためのイソシアネート基を上記基材表面に適当な手段によって直接導入する方法や、イソシアネート基を有する皮膚性の化合物を被覆等の手段によって上記基材表面に担持させる方法、イソシアネート基を有する化合物を上記基材表面に共有結合を介して担持させる方法等が

挙げられる。

【0028】例えば、上記方法の内でも、イソシアネート基を有する皮膜性の化合物を被覆等によって基材表面に担持させる方法として、具体的には、イソシアネート基を有する皮膜性の化合物を必要に応じて適当な溶媒に溶解し、得られた溶液をスプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコーター等の方法によって基材表面の一部または全体に塗布し、さらに必要に応じて乾燥させることで、被覆を施す等の手段が挙げられる。また、この様にして基材表面に被覆が可能なイソシアネート基を有する化合物として、具体的には、末端にイソシアネート基を有するポリカルボジイミド類や、例えば、イソシアネートプロピルトリエトキシシラン等のイソシアネート基を有するトリアルコキシシラン等が挙げられる。

【0029】また、基材表面に共有結合によりイソシアネート基を有する化合物を担持させる方法として、具体的には、イソシアネート基とそれ以外に基材表面に共有結合するための官能基を有する化合物を、表面に前記化合物が有する官能基と共有結合可能な官能基を有する基材の官能基に、適当な方法によって共有結合させる方法等が挙げられる。この様にして得られる本発明の、共有結合によりイソシアネート基を有する化合物が溶剤不溶性の基材表面に担持されてなる担体は、イソシアネート基を有する化合物が共有結合を介して強固に基材表面に担持されているものであり、耐久性等に優れた担体である。

【0030】さらに、上記共有結合によりイソシアネート基を有する化合物を基材表面に担持させる方法として、より具体的には、以下に説明する本発明の製造方法を挙げることができる。

【0031】本発明の製造方法は、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体を製造する方法であって、2個以上のイソシアネート基を有するまたは1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物（以下、単に「イソシアネート化合物」ということがある）を、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは前記イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材の官能基に、前記化合物の有するイソシアネート基の少なくとも1個を残して共有結合させる工程を含むことを特徴とするものである。

【0032】上記本発明の製造方法に用いるイソシアネート化合物のうち、分子内に2個以上のイソシアネート基を有する化合物として、具体的には、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンジイソシアネート、テトラメチルキシレンジイソシアネート、ナフタレンジイソシアネート等が挙げられる。

【0033】また、分子内に1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基あるいはハロゲン原子を有する化合物のイソシアネート基以外の官能基として、具体的には、水酸基、アミノ基、イミノ基、カルボキシル基等の官能基が挙げられ、この様なイソシアネート化合物として、具体的には、イソシアネートクロロメチルエステル、イソシアネートクロロエチルエステル等が挙げられる。

【0034】本発明の製造方法に用いる、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは上記化合物の有するイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材としては、例えば、上記<1>（1）で説明した基材表面に前記共有結合可能な官能基を導入した溶剤不溶性の基材が挙げられる。導入される官能基としては、イソシアネート基と共有結合可能な官能基または上記化合物が有するイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基であれば特に制限されないが、具体的には、水酸基、イミノ基、アミノ基、カルボキシル基等が挙げられる。これら官能基は、上記イソシアネート化合物の有する官能基に応じて適宜選択され、基材表面に導入される。

【0035】また、溶剤不溶性基材表面にこの様な官能基を導入する方法については、基材の材質や導入する官能基によって適当な方法が適宜選択される。さらに、官能基を導入するのは、基材表面の全体であってもよいし、一部であってもよい。

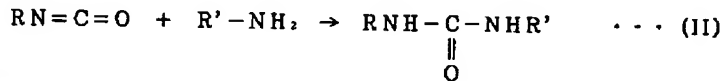
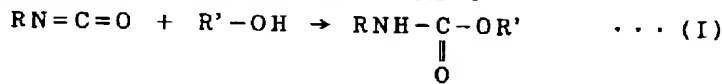
【0036】例えば、ガラス基材の表面全体にアミノ基を導入するには、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間浸漬した後、これを取り出して溶液を水洗しさらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥すればよい。

【0037】また、ガラス基材にアミノ基以外の官能基を導入する場合や、基材がガラス以外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般に行われていることであり、その方法も公知であるので、この様な公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

【0038】さらに、上記<1>（1）で挙げた基材のうちでもプラスチック基材のなかには、基材表面に既に上記のような官能基を有するものもあり、この場合には基材表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま本発明の製造方法に用いることが可能である。また、この様なプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して本発明に用いることも可能である。

【0039】本発明の製造方法においては、上記の様に得られる2個以上のイソシアネート基を有するまた

は1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物と、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは前記イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材を適当な条件下で反応させ、前記基材表面の官能基に前記化合物を前記化合物の有するイソシアネート基の少なくとも1個を残して共有結合させる。つまり、前記化合物が1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物である場合には、イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子が共有結合に供する様な反応条件で反応を行えばよい。また、官能基としてイソシアネート基



<2>生物学的に活性な物質およびその担体への固定化
(1) 生物学的に活性な物質

本発明の担体に固定化する生物学的に活性な物質としては、イソシアネート基と共有結合可能な官能基を有するものであれば特に制限されないが、例えば、タンパク質、ペプチド若しくはその他の抗体結合性物質、核酸などの生体高分子等を挙げることができる。

【0042】具体的には、タンパク質、ペプチドとしては、インシュリン、ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）、オキシトシン等のタンパク質ホルモンもしくはペプチドホルモン、コリンエステラーゼ、アミラーゼ、ペプシン等の酵素又はその前駆体、HBs抗原、HIV抗原等のタンパク質抗原、プロテインAのような抗体結合性タンパク質などが、抗体結合性物質としては低分子量のハプテンが、核酸としては天然又は合成のDNA（オリゴヌクレオチドを含む）もしくはRNA（オリゴヌクレオチドを含む）が挙げられる。

【0043】さらに、本発明に用いられる生物学的に活性な物質として具体的には、次のような化合物も例示可能である。抗菌性を有する生理活性物質、例えばペニシリン、アンピシリン、セファロスポリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、フラジオマイシン、デストマイシン、カスガマイシン、タイロシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、スピラマイシン、リンコマイシン、コリスチン、バシトラシン、サリノマイシン、モネンシン、ラサロシド、テトラサイクリンおよびその類縁物質、クロラムフェニコール、バージニアマイシンなど。合成抗菌剤としてはサルファ剤、オキシソリン酸、ピロミド酸、フラゾリドン、ジフラゾンなどが挙げられ、天然毒素全般としてはアフラトキシン、T2トキシン、ゼアラレノン、デオキシニバレノール、パツリン、フモ

のみを有する化合物を用いる場合には、イソシアネート基の全てが共有結合に供されることのないような条件で反応を行えばよい。

【0040】このようにして得られる本発明の表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定化するための担体は、イソシアネート基の反応性を利用して、様々な活性物質を固定することができるものである。また、イソシアネート基の反応性を示す例としては、下記(I)に示す水酸基との反応、下記(II)に示すアミノ基との反応等が挙げられる。

【0041】

【化1】

ニシン、HT-2、オクラトキシン、テトロドトキシン、オカダ酸、サキシトシン、ゴニオトキシン、ボツリヌス毒素などが挙げられ、合成化学品としては農薬全般、例えばダイオキシン、2,4-D、ベミノル、アルディカルブ、カルボフラン、メソミル、DDVP、馬拉ソン、パラコート、ダイアジノン、フェニトロチオン、エンドリン、アルドリン、ヘプタクロルなどが挙げられる。また、生体化学物質全般としてはヘモグロビン、α-フェトプロテイン、免疫グロブリン、アルブミン、アンチトロンビン、トロンビン、プラスミノゲン、フェリチン、チログロブリン、ゼラチン、コレステロール、テストステロン、コルチコステロン、プロゲステロン、エルゴステロール、エストラジオール、チクロムC、アドレナリン、各種ビタミン等が挙げられる。

【0044】また、上記タンパク質、ペプチド、その他の生物学的に活性な物質に結合し得る抗体が挙げられる。該抗体は、例えば上述の物質又は免疫用担体との結合物を、免疫動物例えばラット、モルモット、ウサギ、マウス、ヤギ、ヒツジ、馬、牛などの哺乳類に免疫して得るか、マウスに免疫後そのリンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体として得られる。

【0045】(2) 担体への固定化

上記本発明の表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するためには、上記生物学的に活性な物質を固定するには、前記担体のイソシアネート基と生物学的に活性な物質が反応する様な適当な条件下で、前記担体と生物学的活性物質とを接触させればよい。具体的には、両者の接触は、固定される生物学的活性物質の活性が維持されるように、通常は水またはバッファー中で行うことが好まし

く、また、接触の際の温度としてはやはり固定される生物学的活性物質の活性が損なわれないように、概ね0～100℃とすることが好ましい。さらに、固定される生物学的活性物質の種類等により最適な条件が適宜選択可能である。

【0046】この様にして得られる固定化生物学的活性物質は、前記生物学的活性物質が担体に非常に強固に担持されたものであり、イムノアッセイの分野で広く使用されている洗浄法（界面活性剤を用いた洗浄法）によっても脱離することがなく、固定化酵素の生理化学工業的利用、抗体あるいは抗原固定担体の免疫学的利用、核酸固定担体の診断薬としての利用等の広い利用分野を有している。

【0047】(3) 生物学的に活性な物質の分析法
本発明の担体は、具体的には、以下の分析法に用いることにより効果を発揮することができる。

【0048】すなわち、本発明の表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる生物学的に活性な物質を固定するための担体は、担体に固定化された生物学的に活性な第1の物質と、この第1の物質に特異的に結合し得る第2の物質とを反応させ、前記第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、試料中の第1の物質又は第2の物質を分析する方法に、前記担体として用いることが可能である。この際、前記第1の物質はイソシアネート基を介して担体に固定化されるものである。

【0049】上記生物学的に活性な第1の物質としては、上記<2>(1)で説明した生物学的に活性な物質と全く同じものを挙げることができる。一方、生物学的に活性な第2の物質は、上記のような第1の物質と同様のタンパク質、ペプチド、抗原性物質、核酸、その他の生理活性物質であって、第1の物質に特異的に結合するものである。すなわち、例えば、第1の物質と第2の物質の一方がタンパク質、核酸又はその他の生理活性物質である場合には、他方はそれに対する抗体であり、一方の物質が核酸である場合には、他方はその核酸の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有する核酸である。ここで実質的に相補的とは、1又は2以上のミスマッチがあっても、各々の核酸が水素結合によってハイブリダイズし、2本鎖を形成することができることをいう。

【0050】尚、分析対象は、第1の物質であっても、第2の物質であってもよい。本発明による生物学的に活性な物質の分析法は、上記のような生物学的に活性な第1の物質を前記担体に結合させ、これと第2の物質とを反応させ、第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、行われる。

【0051】第1の物質を担体に固定するには、担体と活性物質とを接触させれば良く、担体が基材表面に有す

るイソシアネート基と、第1の物質が有する水酸基、アミノ基、チオール基、カルボキシル基等との反応により、第1の物質はイソシアネート化合物と共有結合する。その結果、第1の物質は担体に固定化される。

【0052】第1の物質と担体との接触は、上記<2>(2)で説明したのと同様であり、第1の物質の生物学的活性が維持されるように、水あるいはバッファー中で行うことが好ましく、また、接触の際の温度としては、やはり活性物質の活性が損なわれないように、0～100℃とすることが好ましい。

【0053】尚、担体へ第2の物質等が非特異的に結合することを防ぐために、第1の物質を担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、サケ精子DNA等を担体に接触させ、フリーのイソシアネート基をブロックしておくことが好ましい。

【0054】担体に固定化された第1の物質と第2の物質とを反応させた後、担体に結合した第2の物質を検出するには、通常の固相のイムノアッセイ、核酸のハイブリダイゼーション法と同様に行えばよい。例えば、第1の物質が測定対象である場合には、標識物質で標識しておいた第2の物質を固定化された第1の物質と反応させ、担体に固定化された標識物質を検出又は定量することにより、結合した第2の物質を検出又は定量することができる。その結果、第1の物質を検出又は定量することができる。第1の物質に結合した第2の物質のかわりに、結合しなかつて第2の物質を検出、定量してもよい。

【0055】また、第2の物質が測定対象である場合には、第1の物質と第2の物質とを反応させる際に、反応系に標識物質で標識された第2の物質をさらに加え、第1の物質に結合した標識された第2の物質の結合量により、間接的に試料中の第2の物質の量を定量することができる(阻害法)。

【0056】さらに、担体に結合した第2の物質の検出は、第2の物質に特異的に結合し得る、第3の物質を反応させることによっても行うことができる。例えば、第2の物質が抗原であり、第1の物質がこの抗原に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体(第1抗体)である場合、担体-抗体-抗原複合体に、ポリクローナル抗体又は前記モノクローナル抗体とエпитープが異なる他のモノクローナル抗体(第2抗体)を反応させ、担体-抗体-抗原-抗体複合体を形成させ、複合体中の第3の物質を検出することにより、第2の物質を検出することができる(サンドイッチ法)。このとき、第3の物質が標識されている場合にはその標識を検出すればよく、標識されていない場合であっても、さらに第3の物質に結合する物質を用い、これを標識しておいてもよい。例えば、上記の例では第1抗体と第2抗体とを別の動物で調製し、第2抗体の調製に用いた動物のイムノグロブリンに対する抗体を第3の物質とする。また、核

酸の場合も同様に、担体に固定化した第1の核酸にこれに特異性を有する第2の核酸を結合させ、さらに第2の核酸に特異性を有し第1の核酸に特異性を有しない第3の核酸を結合させ、担体に結合した第3の核酸の量から第2の核酸を定量することができる。

【0057】また乳濁状の担体を用いて、一般的な凝集法により、第2の物質を検出することもできる。標識物質としては、放射性物質、蛍光物質、酵素、色素、化学発光物質、ジゴキシゲニン等が挙げられる。放射性物質、蛍光物質、色素で標識した場合には、標識はシンチレーションカウンターによる測定、フィルムへの露光あるいは肉眼観察により、直接検出することができる。酵素を用いた場合には、酵素反応により発色または発光する基質色素を用い、その発色または発光を検出すればよい。このような酵素は、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、リゾチームなど一般的に用いられるものでよい。

【0058】また、必ずしも標識物質自体が検出することができないものであってもよい。例えば標識物質としてビオチンを用いた場合には、これに特異的に結合するアビジン又はストレプトアビジンを結合させた酵素等を用いることにより、間接的に検出することができる。

【0059】第1の物質と第2の物質、さらに必要に応じて第3の物質又はその他の物質を反応させた後に未反応の物質を除去、すなわちB/F分離するには、通常の固相イムノアッセイ、ハイブリダイゼーション法と同様に行えばよい。すなわち、担体が容器状である場合には、担体に洗浄液を満たしたのち、洗浄液を捨てるという操作を度繰り返す。担体が粒子である場合には、洗浄液に担体を懸濁する操作を繰り返せばよい。

【0060】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

【0061】

【実施例1】 イソシアネート化スライドガラスに固定したDNAの標識DNAによる検出

(1) アミノ化スライドガラスの作製

蒸留水180mlに10% (v/v) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン/エタノール溶液20mlを加えよく攪拌した。そこに6NのHClを加えpH3~4に調整した後、スライドガラス15枚を浸漬し、75℃で2時間加熱処理した。加熱処理終了後、スライドガラスを溶液から引き上げ、蒸留水でよく洗い流した後、115℃で4時間加熱乾燥しアミノ化スライドガラスを得た。

【0062】(2) イソシアネート化スライドガラスの作製

ヘキサメチレンジイソシアネートの2.5%クロロホルム溶液に上記で得られたアミノ化スライドガラス15枚を浸漬し、すぐに引き上げた。次いで、クロロホルム200mlによる10分間の洗浄を2回行った後、40℃

で2時間乾燥してイソシアネート化スライドガラスを得た。

【0063】(3) イソシアネート化スライドガラス上へのDNAオリゴマーの固定

DNA合成機によりキャプチャーオリゴヌクレオチド及びビオチン化オリゴヌクレオチドを合成した。プローブは、DNAオリゴマー合成の際にビオチンフォスフォルアミダイトを用いて、ビオチンを5'末端に導入した。

【0064】上記で得られたイソシアネート化スライドガラス上にキャプチャー水溶液の希釈系列(1pmol/ μ l、100fmol/ μ l、10fmol/ μ l、1fmol/ μ l)をそれぞれ1 μ lドットし37℃のインキュベーターで15分間固定化した後、水で洗浄し乾燥した。

【0065】一方、コントロールとして上記プローブと全く相補性を示さないオリゴマーも同様に固定化した。

(4) ハイブリダイゼーション

キャプチャーオリゴヌクレオチド又はコントロールDNAオリゴマーを固定化したイソシアネート化スライドガラスにプレハイブリダイゼーション溶液50 μ lをふりかけ、パラフィルムで覆って、42℃のインキュベーターに入れ30分間加温した。プレハイブリダイゼーション溶液の組成は、5 \times SSC(0.75M NaCl, 0.075M クエン酸ナトリウム)、5 \times Denhardt's solution(0.02% フィコール, 0.02% BSAフラクションV, 0.02% ポリビニルピロリドン)、25mM リン酸ナトリウム(pH6.6)、50%フォルムアミド、0.5mg/ml変性サケ精子DNAである。

【0066】次にパラフィルムを取り除き、プレハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液50 μ lをふりかけ、パラフィルムで覆って、42℃のインキュベーターに入れ一晩加温した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は、1pmolプローブ、5 \times SSC、1 \times Denhardt's solution、25mMリン酸ナトリウム(pH6.6)、45%フォルムアミド、0.2mg/ml変性サケ精子DNA、10%デキストラン硫酸である。

【0067】ハイブリダイゼーション後に、パラフィルムを取り除き、ハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の3段階の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0068】<ポストハイブリダイゼーション洗浄条件>

第1段階: 2 \times SSC、1%SDS; 室温、5分間、2回

第2段階: 0.2 \times SSC、1%SDS; 42℃、5分間、2回

第3段階: 2×SSC; 室温、5分間、1回

(5) 検出

3% BSAを含む緩衝液A (0.2 M塩化ナトリウム、0.1 Mトリス塩酸 (pH 7.5)、0.05% トライトンX-100) 50 mlに、上記ポストハイブリダイゼーション洗浄後のスライドガラスを浸漬し、室温で30分間ブロッキングを行なった。次に、これらをストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 (緩衝液Aで原液を5000倍希釈したもの) 50 mlに浸漬し、室温で30分間反応させた。次いで、緩衝液A 50 mlに浸漬し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。

【0069】次に、緩衝液B (0.1 M塩化ナトリウム/0.1 Mトリス塩酸、pH 9.5/50 ml塩化マグネシウム) 50 mlで1回置換した。最後に、基質溶液 (緩衝液Bの50 ml + BCIP溶液 (50 mg 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/900 mlジメチルホルムアミド) 17.5 μl + NBT液 (50 mg ニトロブルーテトラゾリウム/1.8 ml 70%エタノール) 35 μl) に浸漬し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、相補的な配列を持つキャプチャーのみににおいて1 pmol/μl ~ 10 fmol/μlまでの濃度でシグナルが得られた。

【0070】

【実施例2】上記実施例1においてイソシアネート化スライドガラスを作製する際にヘキサメチレンジイソシアネートの代わりにトルエンジイソシアネートを用いたことを除いては、上記実施例1と全く同様の操作を行った。結果は、実施例1と同様、相補的な配列を持つキャプチャーのみににおいて1 pmol/μl ~ 10 fmol/μlまでの濃度でシグナルが得られた。

【0071】

【実施例3】上記実施例1においてイソシアネート化スライドガラスを作製する際にヘキサメチレンジイソシアネートの代わりにテトラメチルキシレンジイソシアネートを用いたことを除いては、上記実施例1と全く同様の操作を行った。結果は、実施例1と同様、相補的な配列を持つキャプチャーのみににおいて1 pmol/μl ~ 10 fmol/μlまでの濃度でシグナルが得られた。

【0072】

【実施例4】上記実施例1においてイソシアネート化スライドガラスを作製する際にヘキサメチレンジイソシアネートの代わりにナフタレンジイソシアネートを用いたことを除いては、上記実施例1と全く同様の操作を行った。結果は、実施例1と同様、相補的な配列を持つキャ

プチャーのみににおいて1 pmol/μl ~ 10 fmol/μlまでの濃度でシグナルが得られた。

【0073】

【比較例】カルボジイミド化スライドガラスに固定したDNAの標識DNAによる検出

(1) カルボジイミド化スライドガラスの作製

4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート 17.9 gとシクロヘキシルイソシアネート 12.5 gをカルボジイミド化触媒 (3-メチルー1-フェニルー2-ホスホレン-1-オキシド) 1.3 gと共に窒素雰囲気下、180℃で4日間反応させ、室温で粉末状のカルボジイミド化合物 (重合度10、数平均分子量2400)を得た。これを10 g取りジクロロメタン200 mlに溶解させ、カルボジイミド化合物溶液を得た。

【0074】このカルボジイミド化合物溶液200 mlに上記実施例1の(1)と同様の方法で得られたアミノ化スライドガラス15枚を浸漬し、すぐに引き上げて、60℃で1時間加熱乾燥した。加熱乾燥後、ジクロロメタン200 mlで10分間の洗浄を2回行った後、40℃で2時間乾燥してカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0075】なお、この方法で得られるカルボジイミド化ガラスは、生物学的に活性な物質を固定するための担体として本発明者らが発明したものであり、これを用いれば前記物質の固定が効率的かつ強固に行えることが本発明者らにより確認されている。

【0076】(2) カルボジイミド化スライドガラス上へのDNAの固定とその検出

次いで、上記実施例1の(3)以降の操作においてイソシアネート化スライドガラスの代わりに上記で得られたカルボジイミド化スライドガラスを用いた以外は、上記実施例1の(3)以降と全く同様の操作を行った。結果は、相補的な配列を持つキャプチャーのみににおいて1 pmol/μl ~ 100 fmol/μlまでの濃度でシグナルが得られた。

【0077】これらの結果から、本発明の生物学的に活性な物質を固定化するための担体は、カルボジイミド化スライドガラスと同等かそれ以上に、生物学的に活性な物質を効率よく固定化することが可能であり、また、これを用いて生物学的に活性な物質の検出を行えば感度のよい検出が行えることがわかる。

【0078】

【発明の効果】本発明により、タンパク質、核酸などの活性物質の検出において重要な担体への固定化を、簡便、効率的にかつ強固に行うことができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

ワード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/545

Z

G 0 1 N 33/545

33/547

33/547

33/551

33/551

33/553

33/553

C 1 2 N 15/00

A

(72) 発明者 松村 嘉之

東京都足立区西新井栄町 1-18-1 日清紡

績株式会社東京研究センター内

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA01 BA07 BA31 BA80

HA14 HA15

4B033 NA22 NA43 NA45 NB04 NB27

NB33 NB43 NB63 NC03 NC12

ND05

4B063 QA01 QQ42 QR13 QR32 QR55

QR56 QR58 QR84 QS34

4H045 AA20 AA30 BA60 DA75 DA86

EA50 FA44 FA81